

# Topographically enhanced cell culture systems to induce and monitor mechanobiology

Citation for published version (APA):

Beijer, N. R. M. (2018). *Topographically enhanced cell culture systems to induce and monitor mechanobiology*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.  
<https://doi.org/10.26481/dis.20180413nb>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2018

**DOI:**

[10.26481/dis.20180413nb](https://doi.org/10.26481/dis.20180413nb)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary



Regenerative medicine solutions become increasingly interesting for solving health problems of patients. Here, the patient's own cells can be used in combination with a biomaterial in order to regenerate the function of a damaged tissue. Such a biomaterial is preferably able to support cells as a biocompatible carrier and additionally able to control the behavior of the cells which are in direct contact. To develop functional biomaterials able to control cell behavior in desired ways, there is a need to understand the mechanisms underlying cell-material interactions. In **chapter 1**, we introduced these interactions and compared the native environment of cells *in vivo* with the engineered environment we introduce cells to *in vitro*. Here, we were especially interested in physical stimuli coming from those biomaterials, and how these stimuli trigger cell-material interaction via mechanotransduction. Furthermore, we introduced the research aims of this thesis, the development of novel tools to induce and monitor mechanobiology and touched upon the involved molecular signaling.

Before starting the experimental work, we reviewed the literature to learn about the wonderful ways nature has found to deal with mechanobiological problems. In **chapter 2**, we explored what is needed to create a biological system 'ready-to-react' to physical stimuli, and hypothesized ways to use this knowledge for designing new instructive biomaterials.

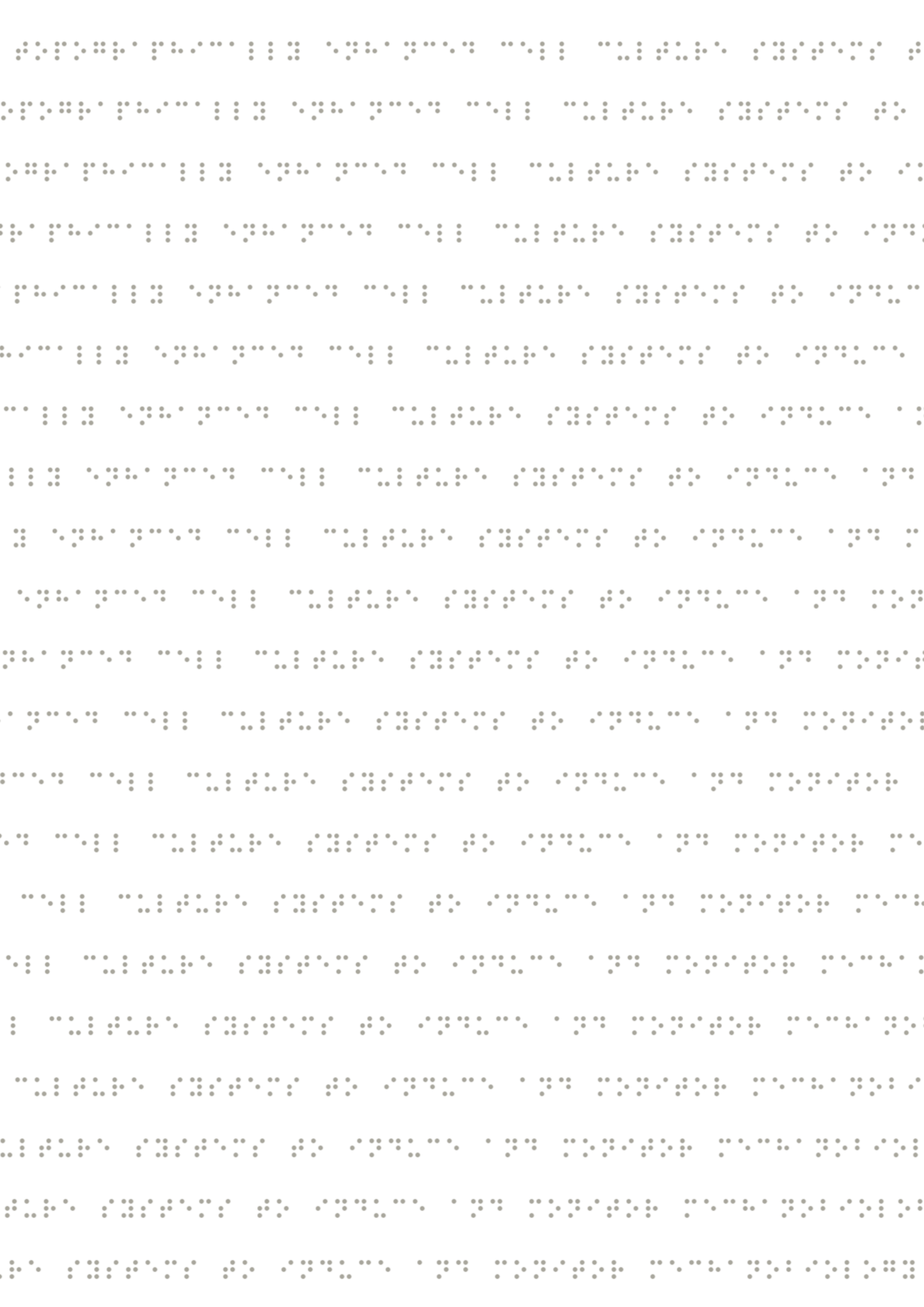
In **chapter 3**, we used a holistic approach to explore the molecular mechanisms underlying mechanobiological osteogenic differentiation. For this, we selected a TopoChip-derived surface topography which was proven to induce osteogenesis solely by physical stimuli from the surface structure. We found a strong correlation between cytoskeletal organization and alkaline phosphatase expression, a marker for osteogenesis. Furthermore, we found pronounced differences in focal adhesion complex formation on topographically enhanced substrates compared to cells cultured on flat substrates. Using a candidate approach, we observed the early activation of mechanosensitive proteins YAP, ERG1, and SRF, which diminished after 24 hours when cell adhesion was completed. Transcriptomics analysis revealed a clear role for HIF-induced gene expression in cells cultured on the osteogenic topographies. Interestingly, a non-canonical HIF-signaling must have been initiating this gene expression since we did not observe a hypoxia-like response. Finally, we also found a pronounced role for epigenetics based on gene expression profiles which matched the epigenetic affecting drug trichostatin A and dramatically deformed nuclei.

Besides differentiation, we also explored the influence of surface topography on basic cell physiology. In **chapter 4**, we described the adaptation of cells to topographically enhanced substrates which takes place during the first hours after attachment. Here, we observed a quick cellular response that led to a reduction of cell and nucleus volumes. Furthermore, these cells also lowered their metabolism and inhibited cell cycle progression. Interestingly, cells cultured on topographically enhanced substrates – with a lower metabolism and proliferation rate – were less affected by anti-cancer drugs.

To study cell-topography interaction in high-throughput using assays other than imaging-based, we developed the TopoWellPlate. In **chapter 5**, we introduced this topographically enhanced 96-well plate and described the cleanroom production pipeline to produce these plates. Furthermore, we measured the metabolic activity via metabolized culture medium as a proof of principle experiment to show the potential of the TopoWellPlate as a cell culture tool. We observed that our surface topographies all resulted in a reduction of mitochondrial activity (as a measure of the cellular metabolism) with a maximum of a 2.5-fold difference in this screen. The use of the TopoWellPlate was further explored in **chapter 6**, and this time in a clinically more relevant context. Here, we screened surface topographies for their influence on the secretome fingerprints of kidney-derived perivascular stromal cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. We observed a strong correlation between cell shape and secretion fingerprint for the kidney-derived cells, however, this correlation was less pronounced in bone marrow-derived cells.

In the final experimental chapter, **chapter 7**, we introduced the NanoTopoChip. This TopoChip-sibling has topographical features at the nanometer scale which caused a completely different interaction with cells compared to micrometer scale topographical features. Using the NanoTopoChip we were able to induce a wide variety of cell-topography interactions, ranging from very strong cell attachment with many filopodia, towards a lack of focal adhesion complex formation and resulting in a diffuse g-actin organization.

In sum, this thesis provides new evidence on specific cellular responses to, and initiated molecular signaling by surface topography, and thereby contributes to elucidation of underlying mechanisms of mechanotransduction. Additionally, two novel topographically-enhanced cell culture systems are introduced proven to be useful to induce and monitor mechanobiology. These conclusions are discussed in **chapter 8**, where we carefully place notice on (dis)advantages of the used read-outs and the meaning of the results. Furthermore, we suggested development of novel materials and analytic tools as envisioned future directions for cell-surface topography research. Finally, in **chapter 9**, we commented on the potential societal and economic impact of this thesis, and in particular the development of the TopoWellPlate as an optimized cell culture tool ideal for many research laboratories and pharmaceutical companies.



# Samenvatting



Tijdens ons leven kunnen verschillende functies in ons lichaam verminderen in kwaliteit of zelfs helemaal weg vallen. Denk hierbij aan chronische nierziekten of diabetes, maar ook bijvoorbeeld aan grote gaten in botten na het verwijderen van tumoren of versleten gewrichten. Momenteel zijn er voor veel van deze problemen oplossingen beschikbaar waarmee de functie (deels) wordt hersteld. Zo kan de nierfunctie deels over worden genomen door het dialyseren van het bloed, het bloedsuikergehalte van diabetespatiënten gecontroleerd met het spuiten van insuline, en een versleten gewricht worden vervangen met een orthopedisch implantaat. Maar in plaats van een volledige functieovername zou het in veel gevallen eigenlijk meer gewenst zijn om het oude weefsel weer functioneel te herstellen. Dit is dan ook precies het doel van de regeneratieve geneeskunde.

In het wetenschapsveld van de regeneratieve geneeskunde worden talrijke van deze gezondheids-gerelateerde problemen onderzocht. Karakteristiek voor de oplossingen die via regeneratieve geneeskunde worden aangedragen is het gebruik van lichaamseigen cellen in combinatie met biomaterialen. Onder de verzamelnaam ‘biomaterialen’ vallen vele verschillende materialen, allemaal met unieke eigenschappen. Het idee achter het gebruik van biomaterialen in de regeneratieve geneeskunde is tweeledig: (1) zijn ze geschikt als dragermateriaal voor de cellen die moeten worden geïmplant, en (2) er is de laatste 20 jaar steeds meer bewijs voor de mogelijkheden om cellen instructies te geven via deze biomaterialen. Waar een medicijn een specifieke chemische prikkel kan geven aan bijna alle cellen in het lichaam, kunnen biomaterialen ook juist heel specifiek de direct aangrenzende cellen stimuleren. Op deze manier kan bijvoorbeeld heel gericht de afgifte van medicijnen gereguleerd worden, en dat precies op de plaats in het lichaam waar de functie van het weefsel hersteld moet worden.

Bij het regenereren van weefsels is het ook van belang dat het weefsel kan groeien en dat oude cellen vervangen kunnen worden door nieuwe. Als bron voor deze groei en vernieuwing worden vaak volwassen stamcellen gebruikt. Deze kunnen uit de patiënt zelf worden gehaald. Het huidige onderzoek waarin biomaterialen gebruikt worden om weefselfuncties te herstellen richt zich met name op de interactie tussen de materialen en stamcellen. Via deze communicatie kunnen biomaterialen door hun chemische samenstelling stamcellen instructies geven. De mogelijkheden van dergelijke interacties worden momenteel veel onderzocht, en de bewijzen voor het gebruik stapelt zich op. Zo zijn er voorbeelden van biomaterialen die stamcellen kunnen laten delen, of kunnen laten differentiëren naar een meer gespecialiseerde cel die de functie kan overnemen van het beschadigde originele weefsel.

Naast de effecten van de chemische samenstelling zien we ook steeds meer voorbeelden waarin de fysieke eigenschappen van biomaterialen cellen instructies kunnen geven. Factoren die hierbij een rol spelen zijn bijvoorbeeld hoe hard of zacht het materiaal is, en de oppervlaktestructuur van het materiaal op micrometer- of zelfs de nanometerschaal. Het effect van materiaaloppervlaktestructuren op stamcellen is het thema van dit proefschrift. Hierin is geprobeerd om zoveel mogelijk te weten te komen over wat die fysieke prikkels nu precies

doen met stamcellen en waarom de cellen hierop reageren. Wanneer we de biologische mechanismes namelijk snappen kunnen we deze kennis gebruiken om heel gericht betere biomaterialen te ontwikkelen, en deze in te zetten om specifieke weefsels en functies te ondersteunen.

Om inzicht te krijgen in de invloed van fysieke prikkels op het functioneren van cellen hebben we in onze groep sinds een aantal jaar een door ons ontwikkeld speciaal celkweekstelsel. Op een stukje plastic van 2 bij 2 centimeter hebben we 66 bij 66 minuscule bakjes gecreëerd, elke met zijn eigen unieke oppervlaktestructuur op de bodem. Dit vernuftige hulpstuk noemen we de *TopoChip*, en wordt gebruikt om in één oogopslag 2176 unieke oppervlaktestructuren te bestuderen. (Notabene:  $66 \times 66 = 4356$  bakjes, waarvan 4 bakjes zonder structuur (vlak):  $4356 - 4 = 4352$ , en voor de zekerheid hebben we elke oppervlaktestructuur 2 keer opgenomen in het ontwerp:  $4352 / 2 = 2176$  unieke oppervlaktestructuren) De oppervlaktestructuren die gebruikt zijn op de *TopoChip* zijn rijen van pilaren die door het repeterende gebruik een homogene structuur maken. De unieke vorm van deze pilaren geeft dus het unieke karakter aan de oppervlaktestructuur. Deze vorm is gecreëerd door een computerprogramma wat driehoeken, cirkels en vierkanten heeft gecombineerd in willekeurige hoeveelheden, van willekeurige formaten en op willekeurige posities. Door 2176 verschillende oppervlaktestructuurontwerpen tegelijkertijd te bekijken kunnen we gaan uitrekenen welke eigenschappen van de structuur zorgen voor welke reactie van cellen. Met deze kennis kunnen we vervolgens ook gaan proberen te voorspellen hoe een oppervlaktestructuur eruit moet gaan zien om cellen te beïnvloeden, precies zoals wij dat willen. Op de experimenten in hoofdstuk 7 na, gebruiken we altijd oppervlaktestructuren afkomstig van de *TopoChip* op micrometer schaal.

In **hoofdstuk 1** wordt de vergelijking gemaakt tussen de directe omgeving van cellen in het menselijke lichaam en de manier waarop we deze omgeving na kunnen bootsen in het laboratorium. Welke chemische- en fysieke prikkels ontvangen cellen in het lichaam normaal gesproken, en welke prikkels willen wij namaken om precies de goede instructies te geven met behulp van biomaterialen. Momenteel is de kennis nog niet toereikend om alle mogelijke prikkels na te maken, maar de technologische ontwikkelingen die momenteel in volle vaart zijn maken dat er steeds nieuwe biomaterialen ontwikkeld kunnen worden. In **hoofdstuk 2** stellen we voor om naar de natuur om ons heen te kijken om daar naar voorbeelden te zoeken van biologische systemen die op fysieke prikkels reageren. Waarom zouden we zelf iets nieuws verzinnen als de natuur het in miljoenen jaren al tot in perfectie ontwikkeld heeft. Zo vinden we in de wonderlijke wereld om ons heen bijvoorbeeld planten die dicht gaan als ze worden aangeraakt ter bescherming tegen dieren die ze op willen eten, kleine propellers van zwemmende bacteriën die een functie hebben tijdens de aanhechting aan oppervlaktes, en de formatie van een laagje eelt op de huid van onze handen om onderliggende cellen te beschermen tegen herhaaldelijke wrijving.



In **hoofdstuk 3** richten we ons dan vervolgens op de mechanismen die cellen opstarten wanneer ze een fysieke prikkel krijgen die aanzet tot het vormen van bot. Door proeven uit te voeren hebben we geprobeerd te achterhalen wat er precies in cellen gebeurt wanneer ze aan een oppervlaktestructuur hechten waarvan we weten dat ze aanzetten tot het vormen van bot. We hebben gevonden dat cellen heel anders aanhechten aan deze materialen en vervolgens hun skelet ook anders organiseren. Verder hebben we gevonden dat ze vanaf het eerste moment van aanhechting al andere genen gaan gebruiken, en dus andere eiwitten aan gaan maken die dan door de cellen kunnen worden gebruikt. We hebben ook geobserveerd dat deze cellen sterk vervormde celkernen hebben, wat kan betekenen dat het gebruiken van het DNA in deze celkernen anders is dan in de conditie met een vlakke ondergrond. Wanneer we een compleet overzicht hebben van alle veranderingen in cellen die oppervlaktestructuren kunnen veroorzaken, kunnen we deze kennis gebruiken om vervolgens slimme materiaaloppervlaktestructuren te ontwerpen. Met deze kennis kunnen we dan bijvoorbeeld oppervlaktes van orthopedische implantaten verbeteren, zodat hun levensduur in het lichaam verlengd zou kunnen worden.

Volledig geïntrigeerd door het effect dat oppervlaktestructuren op cellen kunnen hebben, zijn we in **hoofdstuk 4** dieper ingegaan op een tal van basale cellulaire processen die veranderen door fysieke prikkels. Zo hebben we waargenomen dat cellen hun volume snel kunnen verkleinen wanneer ze in aanraking komen met onze oppervlaktestructuren. Tegelijkertijd verkleinen ze ook het volume van de kern tot een derde, verlagen ze hun energieverbruik tot een derde en delen ze langzamer. We noemen dit ‘de aanpassing van cellen aan hun nieuwe omgeving’, waarin ze dus fysiek begrensd worden door de oppervlaktestructuur van het materiaal. Door deze aanpassingen in basale cellulaire processen bleken de cellen op oppervlaktestructuren bijvoorbeeld ook minder vatbaar voor medicijnen tegen kanker.

Om heel veel verschillende oppervlaktestructuren los van elkaar – maar op het zelfde moment – te kunnen testen, hebben we vervolgens een nieuw celkweekstelsel ontwikkeld. Deze celkweekplaat, de *TopoWellPlate*, wordt geïntroduceerd in **hoofdstuk 5**. Om te onderzoeken of deze nieuw ontwikkelde techniek werkt, hebben we het energieverbruik van de blootgestelde cellen tegelijkertijd voor 87 verschillende oppervlaktestructuren gemeten. In **hoofdstuk 6** pakken we vervolgens een klinisch meer relevant probleem aan met de *TopoWellPlate*. Hier onderzoeken we hoe oppervlaktestructuren stamcellen uit de nieren en uit het beenmerg kunnen beïnvloeden. Daarbij zijn we vooral geïnteresseerd in de stoffen die deze cellen uitscheiden, en of we controle kunnen krijgen over de samenstelling van het uitscheidingsprofiel. Vooral in niercellen bleek er een sterke samenhang te zijn tussen de vorm van de cellen (welke afhangt van de onderliggende oppervlaktestructuur) en de kwantiteit waarin de verschillende stoffen worden uitgescheiden.

Waar de oppervlaktestructuren in de voorgaande hoofdstukken 10 micrometer hoog waren en tussen de 10 en 28 micrometer in doorsnede (1 micrometer = 0,001 millimeter), verkleinen we in **hoofdstuk 7** de oppervlaktestructuren naar de nanometerschaal (1 nanometer = 0,000001

millimeter). Het celkweeksysteem wat we hiervoor hebben ontwikkeld hebben we dan ook toepasselijk de *NanoTopoChip* genoemd. In vergelijking met de fysieke begrenzings die cellen ervaren op de micrometerschaal-oppervlaktestructuren, zagen we dat nanometerschaal-oppervlaktestructuren vooral invloed had op de hechting van cellen en de daaruit volgende organisatie van het skelet.

In **hoofdstuk 8** plaatsen we al onze bevindingen in een overkoepelende context, en proberen we lering te trekken uit alles wat we hebben geobserveerd. Daarin komen vragen aan bod over wat we nu precies gemeten hebben met onze meetmethodes, wat de uitkomsten ons nu precies vertellen, wat we kunnen vertrouwen, en waar we nog vraagtekens bij moeten plaatsen. Verder formuleren we ideeën over toekomstige onderzoeksmogelijkheden, en zaken waarmee we verder moeten gaan om ze goed in kaart te brengen. Hier dekken we zowel onze ideeën over de cellen alsmede over de materialen die we ontwikkeld hebben.

Tot slot, in **hoofdstuk 9**, schetsen we wat de sociale en economische waarde kan zijn van de resultaten uit dit proefschrift. Hierin geven we aan wat we voor de maatschappij kunnen betekenen en hoe we bijvoorbeeld patiënten en geïnteresseerde kunnen bereiken. Verder hebben we een voorbeeld uitgewerkt waarin we stellen dat we de *TopoWellPlate* als commercieel verkrijgbaar product kunnen introduceren, en wat hiervan de financiële mogelijkheden zijn wanneer we de markten van de medicijnenindustrie en de wetenschap op de universiteiten aanboren.

